

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-104629

(43)Date of publication of application : 22.04.1997

(51)Int.Cl.

**A61K 31/70**

A61K 48/00

C07H 21/04

(21)Application number : 08-144818

(71)Applicant : KISHIMOTO CHUZO

**SUGIYAMA HARUO**

(22)Date of filing : 16.05.1996

(72)Inventor : YAMAGAMI TAMOTSU

INOUE KAZUJI

**SUGIYAMA HARUO**

(30)Priority

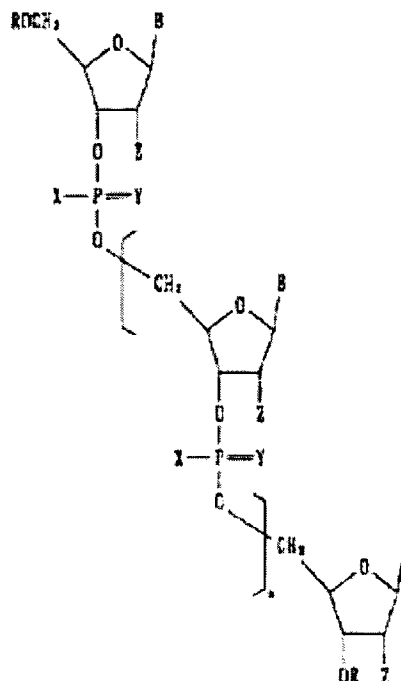
Priority number : 07156672    Priority date : 01.06.1995    Priority country : JP

(54) LEUKEMIA CELL PROLIFERATION INHIBITING AGENT CONTAINING ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDE DERIVATIVE AGAINST WILMS TUMOR GENE (WT1)

(57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain a leukemia cell proliferation inhibiting agent containing an antisense oligonucleotide derivative.

**SOLUTION:** This agent contains an antisense oligonucleotide derivative of the formula (X is O, S, a lower alkyl, a primary amine or a secondary amine; Y is O or S; Z is H or OH; B is adenine, guanine, thymine or cytosine when Z is H and is adenine, guanine, uracil or cytosine when Z is OH; R is H, dimethoxytrityl or a lower alkyl; (n) is 7–28) against a Wilms tumor gene (WT1). The antisense oligonucleotide derivative is e.g. a substance against WT1 of e.g. the transcription capping site, translation initiation region, exon or intron. It is administered by oral administration, intramuscular injection, intraperitoneal administration, endodermic injection, subcutaneous injection, intravenous infusion, introarterial infusion, intrarectal administration, etc.



**\* NOTICES \***

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

**CLAIMS**

[Claim(s)]

[Claim 1] Leukemia-cell-growth inhibitor containing an antisense oligonucleotide derivative to a Wilms' tumor gene (WT1).

[Claim 2] The leukemia-cell-growth inhibitor according to claim 1 in which said antisense oligonucleotide derivative is the antisense oligonucleotide to at least nine nucleotides which a transfer capping site of a Wilms' tumor gene follows.

[Claim 3] Said antisense oligonucleotide derivative is following base sequence: 5'-AGGGTCGAATGCGGTGGG-3' (an array number: 2) or 5'-TCAAATAAGAGGGGCCGG-3' (an array number: 4).

The leukemia-cell-growth inhibitor according to claim 2 which \*\*\*\*.

[Claim 4] The leukemia-cell-growth inhibitor according to claim 1 in which said antisense oligonucleotide derivative is the antisense oligonucleotide to at least nine nucleotides which an initiation field of a Wilms' tumor gene follows.

[Claim 5] Said antisense oligonucleotide is following base sequence: 5'-GTCGGAGCCCATTGCTG-3' (an array number: 6).

The leukemia-cell-growth inhibitor according to claim 4 which \*\*\*\*.

[Claim 6] The leukemia-cell-growth inhibitor according to claim 1 in which said antisense oligonucleotide derivative is the antisense oligonucleotide corresponding to at least nine continuous nucleotides in an exon of a Wilms' tumor gene.

[Claim 7] The leukemia-cell-growth inhibitor according to claim 6 in which said exon is the 6th exon.

[Claim 8] Said antisense oligonucleotide derivative is following base sequence: 5'-CGTTGTGTGGTTATCGCT-3' (an array number: 8).

The leukemia-cell-growth inhibitor according to claim 7 which \*\*\*\*.

---

[Translation done.]

**\* NOTICES \***

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

---

**DETAILED DESCRIPTION**

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention]This invention relates to leukemia-cell-growth inhibitor containing an antisense oligonucleotide derivative.

[0002]

[Description of the Prior Art]Wilms (Wilms) A tumor is a child renal tumor produced by inactivation of both the alleles of the Wilms' tumor gene (WT1) located in the chromosome 11p13 (Call KMet al., Cell 60:509, 1990). the coding region (D. — A.Haber et al.) containing non-code upper stream arrangement [ of WT1 ] (C. E.Campbell et al., Oncogene 9:583-595, 1994), and the intron Proc.Natl.Acad.Sci.USA and 88:9618-9622 (1991) are already reported, and participating in growth and differentiation of a tumor etc. is expected (D. A.Haber et al., the above-shown).

However, WT1 is participating in growth of a leukemic cell and it is not known that the antisense oligonucleotide derivative to WT1 will control and check growth of a leukemic cell.

[0003]

[Problem to be solved by the invention]Therefore, this invention is Wilms (Wilms). Proliferation inhibitor of the leukemic cell containing the antisense oligonucleotide derivative to an oncogene (WT1) is provided.

[0004]

[Means for solving problem]This invention provides leukemia-cell-growth inhibitor containing an antisense oligonucleotide derivative to WT1. An antisense oligonucleotide derivative used by this invention is an antisense oligonucleotide derivative to WT1, such as a thing to a thing to a transfer capping site, a thing to an initiation field, a thing to an exon, or the intron of WT1, for example.

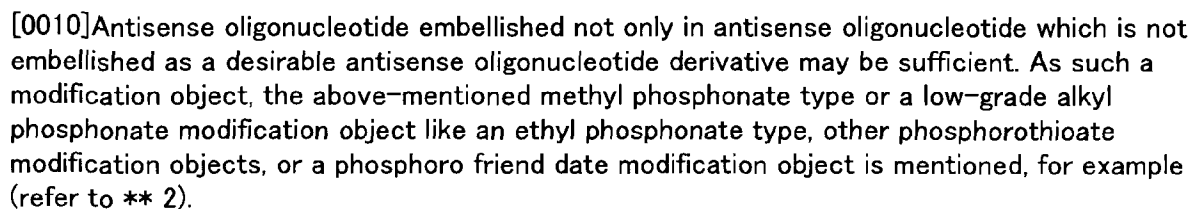
[0005]for example, a base sequence of a sense DNA strand of a field including a transfer capping site of WT1 — array number:, although it is expressed with nine and a base sequence of a sense DNA strand of the exons 1-10 of a coding region of WT1 is expressed with array number:10 - 19, This invention uses an antisense oligonucleotide derivative to a base sequence of a sense DNA strand of such WT1. This antisense oligonucleotide derivative, usually, an antisense DNA strand of WT1 or RNA chain continued — preferably 5-50 pieces, If combinable with a DNA strand or RNA chain of 9-30 base or WT1, it will be a complementary antisense oligonucleotide derivative which comprises 9-50 bases preferably 5-70 pieces intermittently or selectively.

[0006]As a thing to a transfer capping site, things, such as following base sequence:5'-AGGGTCGAATGCGGTGGG-3' (an array number: 2) and 5'-TCAAATAAGAGGGGCCGG-3' (an array number: 4), are mentioned, for example. As a thing to an initiation field, an antisense oligonucleotide derivative to a field including the translation initiation codon ATG and its upper stream, and/or the lower stream is mentioned, For example, the following base sequence: 5'-GTCGGAGCCCATTGCTG-3' (an array number: 6) etc. are mentioned.

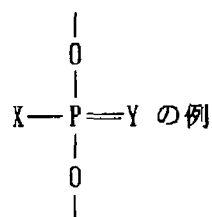
[0007]Ten exons are contained in a coding region of WT1, and an antisense oligonucleotide derivative of this invention, A thing to arrangement included in either of these exons, or a thing to arrangement covering any two exons which continue after splicing. Or it is against arrangement of a continuous intron, thing [ to arrangement covering an exon ] and all the introns,

[0008] Although structure of an antisense oligonucleotide derivative used in this invention is as having been shown in \*\* 1, any of oxygen (O), sulfur (S), a low-grade alkyl group, primary amine, or the second class amine may be sufficient as X independently. Any of oxygen (O) or sulfur (S) may be sufficient as Y independently. Z is hydrogen or a hydroxyl group. B is a complementary oligonucleotide of DNA or mRNA which is chosen from either adenine, guanine, thymine or cytosine when Z is hydrogen, is chosen from either adenine, guanine, uracil or cytosine when Z is a hydroxyl group, and mainly encodes WT1. R is hydrogen, a dimethoxytrityl group, or a low-grade alkyl group independently. n is 7-28.

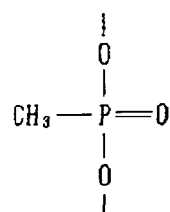
[Chemical formula 1]



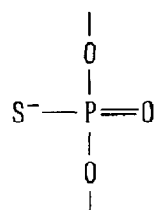
[Chemical formula 2]



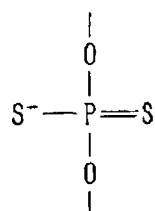
メチルホスホネート



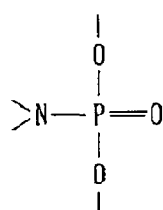
ホスホロチオエート



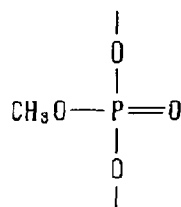
ホスホロジチオエート



ホスホロアミデート



リン酸トリエステル



[0012] These antisense oligonucleotide derivatives can be obtained with a conventional method as follows. Antisense oligonucleotide whose O and Z X and Y of \*\* 1 are hydrogen or a hydroxyl group is easily compounded by commercial DNA synthesizers (for example, product made by Applied Biosystems, etc.).

[0013] Z can acquire a synthetic method of antisense oligodeoxyribonucleotide which is hydrogen by solid-phase-synthesis method which used phosphoramidite, a solid-phase-synthesis method using hydrogen phosphonate, etc. For example, T. Atkinson and M. Smith, in Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, ed. M. J. Gait, IRL Press, and 35-81; (1984) M. H. Caruthers, Science, 230, and 281; (1985) . A. Kume, M. Fujii, and M. Sekine, M. Hata and J. Org. Chem., 49-2139; (1984) B. C. Froehler, M. Matteucci and Tetrahedron. Lett., 27, and 469; (1986) . P. J. Garegg and I. Lindh, T. Regberg and J. Stawinski, R. Stromberg and C. Henrichson, ibid, 27, 4051; (1986) B. S. Sproat, M. J. Gait, in Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach and ed. M. J. Gait, IRL

Press and 83-115; (1984) S.L. Beaucage and M.H. Caruthers and Tetrahedron Lett., 22, and 1859-1862. (1981) M.D. Matteucci and M.H. Caruthers, Tetrahedron Lett., 21, and 719-722; (1980) M.D. Matteucci and M.H. Caruthers and J. Am. Chem. Soc., Refer to 103 and 3185-3191 (1981).

[0014] X a trialkyl phosphate modification object which is a lower alkoxy group, A conventional method, For example, by processing an oligonucleotide obtained by chemosynthesis with DMF / methanol / 2,6-lutidine solution of tosyl chloride. It can obtain (Moody H.M., et al., Nucleic Acids Res., 17, and 4769-4782 (1989)). X an alkyl phosphonate modification object which is an alkyl group, A conventional method, For example, phospho friend DAITO. it can use and obtain (M. — A. —) [ Dorman and ] et.al., Tetrahedron, 40, 95-102; (1984) K.L. Agarwal and F. Riftina, Nucleic Acids Res., 6, and 3009-3024 (1979).

[0015] X a phosphorothioate modification object which is S A conventional method, For example, a solid-phase-synthesis method (C. A. Stein, et.al., Nucleic Acids Res., 16, and 3209-3221 (1988)) using sulfur or tetraethylthiuram Disulfide is used, It can obtain by a solid-phase-synthesis method (H. Vu and B.L. Hirschbein, Tetrahedron Letters, 32, and 3005-3008 (1991)). Both X and Y a phosphorodithioate modification object which is S, For example, it can obtain by a solid-phase-synthesis method by changing screw friend DAITO into thio friend DAITO, and making sulfur act (W. K-D. Brill, et.al., J. Am. Chem. Soc., 111, and 2321-2322 (1989)).

[0016] X a phosphoro friend date modification object which is primary amine or the second class amine, For example, it can obtain by a solid-phase-synthesis method by processing hydrogen phosphonate by the first class or the second class amine (B. Froehler, et.al. Nucleic Acids Res., and 16-4831-4839 (1988)). Or friend DAITO can be obtained even if it oxidizes with tert-butyl hydroperoxide (H. Ozaki, et.al., Tetrahedron Lett., 30, and 5899-5902 (1989)).

[0017] In that the protection must be performed since a synthetic method of antisense oligonucleotide whose Z is a hydroxyl group has a 2'-hydroxyl group in a ribose (sugar) compared with antisense oligodeoxyribonucleotide, although it is very complicated, It is compoundable by choosing a protective group and a phosphorylation method suitably (microbiology basic lecture refer to KYORITSU SHUPPAN Co., Ltd. issue on eight volumes, gene engineering, Eiko Otsuka, Kazunobu Miura collaboration, Tadahiko Ando, edited by SAKAGUCHI, Kenji, and October 10, 1987).

[0018] Refining and a purity check can be performed by high performance chromatography and polyacrylamide gel electrophoresis. It can carry out by a check, Electrospray Ionization Mass Spectrometry, or Fast Atom Bombardment-Mass Spectrometry of a molecular weight. In any stages of resulting in mature mRNA, an antisense oligonucleotide derivative of this invention acts from genomic DNA, and it is thought by controlling the manifestation that growth of a leukemic cell is checked. Therefore, it is expected that antisense oligonucleotide of the invention in this application is effective because of a therapy of leukemia.

[0019] Furthermore, it is thought that an antisense oligonucleotide derivative of this invention checks growth of a leukemic cell specifically, without checking growth of normal marrow cells as mentioned later. Therefore, a leukemia patient's cell, for example, marrow cells, or peripheral blood is taken out to the outside of the body, Application to "autologous bone marrow transplantation" and "private peripheral blood stem cell transplantation" of carrying out in vitro processing with an antisense oligonucleotide derivative of this invention, checking growth of a leukemic cell, and returning only normal marrow cells to the inside of the body again is also possible.

[0020] An antisense oligonucleotide derivative of this invention can be mixed with a suitable inertness base to them, and can be used as external preparations, such as paint and cataplasms. If needed, an excipient, an isotonicizing agent, a solubilizing agent, a stabilizing agent, an antiseptic, a soothing agent, etc. can be added, and a tablet, powder medicine, a granule, a capsule, a liposome capsule, injections, liquids and solutions, a nasal drop, etc. can be further made into a freeze-drying agent. These can be prepared in accordance with a conventional method.

[0021] An antisense oligonucleotide derivative of this invention is adapted to a patient so that it may apply to a patient's affected part directly, or a medicine may be prescribed for the patient into a blood vessel and the affected part may be reached as a result. An antisense enclosure raw material which furthermore improves durability and membrane permeability can also be used.

For example, liposome, poly-L-lysine, lipid, cholesterol, RIPOFE cutin, or these derivatives are mentioned.

[0022] A dose of an antisense oligonucleotide derivative of this invention can be suitably adjusted according to a patient's condition, age, sex, weight, etc., and a desirable quantity can be used for it. According to a patient's condition, a drugs form, etc., a desirable method can be suitably used for the medication method from various medication methods, such as internal use, intramuscular administration, intraperitoneal injection, intracutaneous administration, hypodermic administration, intravenous administration, intraarterial administration, and rectum administration. This invention is explained in detail in an embodiment below.

[0023]

[Working example]

Oligodeoxyribonucleotide (an array number: 1-8) used below for synthetic example 1. was compounded using an automatic synthesizer unit (Applied Biosystems), high performance chromatography refined, and ethanol precipitation was performed 3 times, and it suspended to a phosphate buffer solution. The compound oligonucleotide is as follows.

An array number: Sense arrangement of 1 transfer capping site (SE1)

An array number: Antisense arrangement of 2 transfer capping site (AS1)

An array number: Sense arrangement of 3 transfer capping field (SE2)

An array number: Antisense arrangement of 4 transfer capping field (AS2)

An array number: Sense arrangement of 5 initiation field (SE3)

An array number: Antisense arrangement of 6 initiation field (AS3)

Array number: Sense arrangement of the 7 exon 6 (SE4)

Array number: Antisense arrangement of the 8 exon 6 (AS4)

[0024] the leukemia cell line K562 of the embodiment 1. WT1 manifestation positivity was inoculated into RPMI1640 culture medium which does not contain the fetal calf serum (FCS) in a flat bottom 96-well plate in the quantity of a  $5 \times 10^4$  individual / ml, 100 microl / well. Each oligonucleotide was added so that the last concentration might become a well of three reams in ml and 200 microg /. after the incubation of 2 hours -- each -- FCS was added so that the last concentration might be 10% at a well. The oligonucleotide of the half of the aforementioned quantity was added to the culture every 24 hours.

[0025] After cultivating for 96 hours, the survival cell was calculated with the dye exclusion assay. PBS of the same volume that does not contain a nucleotide was added as a contrast culture, and the cell number of this contrast culture was made into 100%. This result is shown in drawing 1. In the passage clear from this figure, any antisense oligonucleotide checked growth of the cell strongly compared with the corresponding sense oligonucleotide.

[0026] Although the same experiment as the embodiment 2. embodiment 1 was conducted, the oligonucleotides SE3 and AS3 were added by various concentration. Although a sense oligonucleotide (SE3) hardly checked the growth which is a cell in a passage clear from drawing 2, antisense oligonucleotide (AS3) checked growth of the cell on the concentration dependence target.

[0027] Although the same experiment as the embodiment 3. embodiment 1 was conducted, the oligonucleotides SE4 and AS4 were added by various concentration. Although a sense oligonucleotide (SE4) hardly checked the growth which is a cell in a passage clear from drawing 3, antisense oligonucleotide (AS4) checked growth of the cell on the concentration dependence target.

[0028] The same experiment as the embodiment 4. embodiment 1 was conducted. However, the cell was cultured in the flat bottom 24-well plate in the quantity of a  $2.5 \times 10^4$  individual / ml, 1 ml / well. The oligonucleotides SE3 and AS3 were added, and the survival cell number was calculated in two to five days every day. A result is shown in drawing 4. When a sense oligonucleotide was added as for a passage clear from a figure, growth of the cell was seen like the case of contrast, but growth of the cell was controlled when antisense oligonucleotide was added.

[0029] The same experiment as an embodiment 5. embodiment 1 was conducted. However, as an

oligonucleotide, SE3. And AS3 and myeloperoxidase. (MPO) In a gene. Receiving antisense oligonucleotide 5'-AGAGAAGAAGGGAACCCC-3' (an array number: 20) (MPO-AS) and antisense oligonucleotide 5'-GCGTGGGCAGCCTGGGAA-3' to the blood coagulation factor V (FV). (An array number: 21) It used (FV-AS). Growth of a cell was checked, only when AS3 was used so that clearly from drawing 5.

[0030]Although the same experiment as an embodiment 6. embodiment 1 was conducted, WT1 manifestation positive cell stock HEL, THP-1, and WT1 manifestation negative cell strain U937 were used as an experiment cell. As an oligonucleotide, the eight same kinds as a case of Embodiment 1 were used. Growth of a cell was checked by antisense oligonucleotide when WT1 manifestation positive cell system HEL (drawing 6) or THP-1 (drawing 7) was used. On the other hand, when WT1 manifestation negative cell strain U937 (drawing 8) was used, growth of a cell was not checked even if it added antisense oligonucleotide.

[0031]Heparin processing of the marrow cells from an embodiment 7. leukemia patient and a healthy applicant was carried out, and it suspended to RPMI1640 culture medium, and a bone marrow monocyte cell was obtained by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation. The plate of the above-mentioned mononuclear cell was carried out to a flat bottom 96-well plate into which alpha-MEM containing GM-CSF (100 ng/ml) and IL-3 (100 units / ml) was put in quantity of a  $1.5 \times 10^6$  individual / ml, 100microl / well. Processing by an oligonucleotide (SE3 and AS3) was made to be the same as that of Embodiment 1. Cells are collected in 96 hours and it is methylcellulose culture. The plate was carried out to [1.2% methyl cellulose alpha-MEM, 20%FCS, GM-CSF (100 ng/ml), G-CSF (100 ng/ml), and IL-3 (100 units / ml) and SCF (10 ng/ml)]. Culture was performed by three reams. A leukemic cell colony (CFU-L) and a granulocyte-macrophage colony (CFU-GM) were calculated on the 14th.

[0032]Formation of a leukemia colony in a sample from four leukemia patients (an acute-myelogenous-leukemia (AML) binary name, a chronic-myelogenous-leukemia (CML) binary name) is shown in drawing 9. It turns out that an appearance of a colony was checked by antisense oligonucleotide. An appearance of a granulocyte macrophage colony in a sample from a healthy applicant is shown in drawing 10. Formation of a colony was not checked by antisense oligonucleotide, either.

[0033]In an embodiment 8.24-well plate, from a patient who has a  $5 \times 10^4$  cell / K562 cell (A) of a well, or AML to a fresh leukemic cell (B). Random oligonucleotide and oligonucleotide AS1, oligonucleotide AS2, or oligonucleotide AS3 were added by 200 microg/ml concentration, and it added by 100 microg / concentration ml every 24 more hours. A cell was acquired four days after the first processing by an oligonucleotide, and PBS washed, and lysis was carried out with sample buffer solution of Laemli.

[0034]Each cell lysate from a cell of a  $2 \times 10^4$  individual was boiled for 5 minutes, and then it applied to each lane in 7.5% dodecylsulfuric acid sodium polyacrylamide gel. They are after an electrophoresis and protein IMMO billon (Immobilon) It was made to shift to a polyvinylidenedifluoride filter (MilliporeCorp. MA, U.S.). This filter, Synthetic polypeptide (with anti-WT1 polyclonal antibody to amino-acid-locations 177-192;Lys His Glu Asp Pro Met GlyGln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln (an array number: 22).) The probe was carried out and then it processed by horseradish peroxidase joint anti-immunoglobulin antibody (Amersham, Little Chalfont, Britain). A filter was immersed in a detecting reagent (Amersham, Little Chalfont, Britain) after washing for 1 hour, and autoradiograph processing was carried out for 1 to 5 minutes.

[0035]After TBST (Tris-buffer solution which contains Tween 20 0.05%) washes twice, The probe of the filter was carried out by anti-actin monoclonal antibody (Oncogene Science Inc., NY, U.S.), and autoradiograph processing was carried out as mentioned above. Density of a band corresponding to WT1 protein and actin was measured by densitometer CS-9000 (a slip, Kyoto), and a WT1/actin ratio was calculated.

[0036]A result is shown in A and B of drawing 11. In this figure, when the lane 1 adds a random oligonucleotide, the lane 2 adds oligonucleotide AS3, and the lane 3 adds oligonucleotide AS1, the lane 4 shows a result at the time of adding oligonucleotide AS2. When AK562 cell of this



figure is used, B shows a result at the time of using a fresh leukemic cell from a patient who has AML.

[0037]When WT1 oligonucleotide was added to a culture medium of K562 cell so that clearly from A, a level of WT1 protein fell intentionally. On the other hand, a random oligonucleotide as contrast did not affect WT1 protein level. When WT1 oligonucleotide was added to a culture medium of a leukemic cell newly isolated from a patient who has AML so that clearly from B, WT1 protein level fell intentionally. These results show clearly that WT1 antisense oligonucleotide checked growth of a leukemic cell specifically via a fall of WT1 protein level. Antisense oligonucleotide of this invention is expected as a new leukemia treating agent effectively because of inhibition of growth of a leukemic cell therefore as above.

[0038]

[Layout Table]

array number: -- length [ of 1 arrangement ]: -- mold [ of 18 arrangement ]: -- number [ of nucleic acid chains ]: -- kind [ of single strand arrangement ]: -- synthetic DNA arrangement CCCACCGCAT TCGACCCT 18[0039]array number: -- length [ of 2 arrangement ]: -- mold [ of 18 arrangement ]: -- number [ of nucleic acid chains ]: -- kind [ of single strand arrangement ]: -- synthetic DNA arrangement AGGGTCGAAT GCGGTGGG 18[0040]array number: -- length [ of 3 arrangement ]: -- mold [ of 18 arrangement ]: -- number [ of nucleic acid chains ]: -- kind [ of single strand arrangement ]: -- synthetic DNA arrangement CCGGCCCTC TTATTTGA 18[0041]array number: -- length [ of 4 arrangement ]: -- mold [ of 18 arrangement ]: -- number [ of nucleic acid chains ]: -- kind [ of single strand arrangement ]: -- synthetic DNA arrangement TCAAATAAGA GGGGCCGG 18[0042]array number: -- length [ of 5 arrangement ]: -- mold [ of 18 arrangement ]: -- number [ of nucleic acid chains ]: -- kind [ of single strand arrangement ]: -- synthetic DNA arrangement CAGCAATGG GCTCCGAC18[0043]array number: -- length [ of 6 arrangement ]: -- mold [ of 18 arrangement ]: -- number [ of nucleic acid chains ]: -- kind [ of single strand arrangement ]: -- synthetic DNA arrangement GTCGGAGCCC ATTTGCTG 18[0044]array number: -- length [ of 7 arrangement ]: -- mold [ of 18 arrangement ]: -- number [ of nucleic acid chains ]: -- kind [ of single strand arrangement ]: -- synthetic DNA arrangement AGCGATAACC ACACAACG 18[0045]array number: -- length [ of 8 arrangement ]: -- mold [ of 18 arrangement ]: -- number [ of nucleic acid chains ]: -- kind [ of single strand arrangement ]: -- synthetic DNA arrangement CGTTGTGTGG TTATCGCT 18[0046]array number: -- length [ of 9 arrangement ]: -- mold [ of 1272 arrangement ]: -- number [ of nucleic acid chains ]: -- kind [ of single strand arrangement ]: -- synthetic DNA arrangement TGGTATCCTC GACCAGGGCC ACAGGCAGTG CTCGGCGGAG TGGCTCCAGG AGTTACCCGC 60 TCCCTGCCGG GCTTCGTATC. CAAACCCTCC CCTTCACCCC. TCCTCCCCAA ACTGGGCGCC. 120 AGGATGCTCC GGCCGAATA. TACGCAGGCT TTGGGCGTTT. GCCAAGGGTT TTCTTCCCTC. 180 CTAAACTAGC CGCTGTTTTT. CCGGCTTAAC CGTAGAAGAA. TTAGATATTC CTCACTGGAA. 240 AGGGAAACTA AGTGCTGCTG. ACTCCAATTT TAGGTAGGCG. GCAACCGCCT TCCGCCTGGC. 300 GCAAACCTCA CCAAGTAAAC AACTACTAGC CGATCGAAAT ACGCCCGGCT TATAACTGGT 360 GCAACTCCCG GCCACCCAAC TGAGGGACGT TCGCTTTCA. G TCCCGACCTC TGGAACCCAC. 420 AAAGGGCCAC CTCTTTCCCC. AGTGACCCCA AGATCATGGC. CACTCCCCTA CCCGACAGTT. 480 CTAGAGCAAG AGCCAGACTC. AAGGGTGCAA AGCAAGGGTA. TACGCTTCTT TGAAGCTTGA. 540 CTGAGTTCTT TCTGCGCTTT. CCTGAAGTTC CCGCCCTCTT. GGAGCCTACC TGCCCTCCC. 600 TCCAAACCAC TCTTTTAGAT. TAACAACCCC ATCTCTACTC. CCACCGCATT CGACCCTGCC. 660 CGGACTCACT GCTACTGAAC. GGA CTCTCCA GTGAGACGAG. GCTCCCACAC TGGCGAAGGC. 720 AAGAAGGGGA GGTGGGGGGA. GGGTTGTGCC ACACCGGCCA GCTGAGAGCG CGTGTGGGT 780 TGAAGAGGAG GGTGTCTCCG AGAGGGACGC TCCCTCGGAC CCGCCCTCAC CCC. AGCTGCG 840AGGGCGCCCC. CAAGGAGCAG CGCGCGCTGC. CTGGCCGGGC TTGGGCTGCT. GAGTGAATGG 900AGCGGCCGAG. CCTCCTGGCT CCTCCTCTT. CCCGCGCCGC CGGCCCTCT. TATTTGAGCT 960TTGGGAAGCT. GAGGGCAGCC AGGCAGCTGG. GGTAAGGAGT TCAAGGCAGC. GCCCACACCC 1020GGGGGCTCTC. CGCAACCCGA CCGCCTGTGC. CTCCCCCACT

TCCCGCCCTC. CCTCCACCT 1080ACTCATTAC. CCACCCACCC ACCCAGAGCC.  
 GGGACGGCAG CCCAGGCGCC. CGGGCCCCGC 1140CGTCTCCTCG. CCGCGATCCT  
 GGAATTCCTC. TTGCTGCAGG ACCCGGCTTC CACGTGTGTC 1200 CCGGAGCCGG  
 CGTCTCAGCA CACGCTCCGC TCCGGGCCTG GGTGCCTACA GCAGCCAGAG 1260.  
 CAGCAGGGAG TC 1272[0047]array number: -- length [ of 10 arrangement ]: -- mold [ of 457  
 arrangement ]: -- number [ of nucleic acid chains ]: -- kind [ of single strand arrangement ]: --  
 feature [ of synthetic DNA arrangement ]: -- a part of exon 1 of WT1 gene -- arrangement  
 TCTGAGCCTC AGCAAATGGG CTCCGACGTG CGGGACCTGA ACGCGCTGCT  
 GCGCGCGCTC. 60 CCCTCCCTGG GTGGCGGCGG. CGGCTGTGCC CTGCCTGTGA.  
 GCGGCGCGGC GCAGTGGGCG. 120 CCGGTGCTGG ACTTTGCGCC. CCCGGGCGCT  
 TCGGCTTACG. GGTCGTTGGG CGGCCCGCG. 180 CCGCCACCGG CTCGCGCGCC.  
 ACCCCCGCCG CCGCGCCTC. ACTCCTTCAT CAAACAGGAG. 240 CCGAGCTGGG  
 GCGGCGCGGA. GCCGCACGAG GAGCAGTGCC. TGAGCGCCTT CACTGTCCAC 300  
 TTTTCCGGCC AGTTCACTGG CACAGCCGGA GCCTGTGCT ACGGGCCCTT CGTCCCTCCT  
 360 CCGCCCAGCC AGGCGTCAT. C CGGCCAGGCC AGGATGTTTC CTAACGCGCC  
 CTACCTGCCC 420 AGCTGCCTCG AGAGCCAGCC CGCTATTCGC AATCAGG 457[0048]Array  
 number :: The length of 11 arrangement :: Mold of 123 arrangement :: The number of nucleic acid  
 chains :: Kind of single strand arrangement :: The feature of synthetic DNA arrangement :: Exon 2  
 arrangement GTTACAGCAC GGTCACCTTC GACGGGACGC CCAGCTACGG  
 TCACACGCCCTCGCACCATG 60CGGCGCAGTT CCCCAACCAC TCATTCAAGC of WT1 gene  
 ATGAGGATCC CATGGGCCAG CAGGGCTCGC 120TGG 123[0049]Array number :: The length  
 of 12 arrangement :: Mold of 103 arrangement :: The number of nucleic acid chains :: Kind of  
 single strand arrangement :: The feature of synthetic DNA arrangement :: Exon 3 arrangement  
 GTGAGCAGCA GTAATCGGTG CCGCCCCCGG TCTATGGCTG CCACACCCCC  
 ACCGACAGCT 60GCACCGGCAG CCAGGCTTTG CTGCTGAGGA of WT1 gene CGCCCTACAG  
 CAG 103[0050]array number: -- length [ of 13 arrangement ]: -- mold [ of 78 arrangement ]: --  
 number [ of nucleic acid chains ]: -- kind [ of single strand arrangement ]: -- feature [ of  
 synthetic DNA arrangement ]: -- WT1 gene exon 4 arrangement TGACAATTTA TACCAAATGA  
 CATCCCAGCT TGAATGCATG. ACCTGGAATC AGATGAACTT 60AGGAGCCACC TAAAGGG  
 78[0051]array number: -- length [ of 14 arrangement ]: -- mold [ of 51 arrangement ]: --  
 number [ of nucleic acid chains ]: -- kind [ of single strand arrangement ]: -- feature [ of  
 synthetic DNA arrangement ]: -- exon 5 arrangement AGTTGCTGCT GGGAGCTCCA  
 GCTCAGTGAA ATGGACAGAA GGGCAGAGCA A 51 of WT1 gene[0052]Array number :: The  
 length of 15 arrangement :: Mold of 97 arrangement :: The number of nucleic acid chains :: Kind of  
 single strand arrangement :: The feature of synthetic DNA arrangement :: Exon 6 arrangement  
 CCACAGCACA GGGTACGAGA GCGATAACCA CACAACGCCC ATCCTCTGCG GAGCCCAATA  
 60CAGAATACAC ACGCACGGTG TCTTCAGAGG CATTGAG of WT1 gene 97[0053]Array  
 number :: The length of 16 arrangement :: Mold of 151 arrangement :: The number of nucleic acid  
 chains :: Kind of single strand arrangement :: The feature of synthetic DNA arrangement :: Exon 7  
 arrangement GATGTGCGAC GTGTGCCTGG AGTAGCCCCG ACTCTTGAC GGTGGGCATC  
 TGAGACCAGT 60GAGAAACGCC CCTTCATGTG TGCTTACCCA of WT1 gene GGCTGCAATA  
 AGAGATATTT TAAGCTGTCC 120 CACTTACAGA TGCACAGCAG GAAGCACACT G 151[0054]  
 Array number :: The length of 17 arrangement :: Mold of 90 arrangement :: The number of nucleic  
 acid chains :: Kind of single strand arrangement :: The feature of synthetic DNA arrangement ::  
 Exon 8 arrangement GTGAGAAACC ATACCAGTGT GACTTCAAGGACTGTGAACG  
 AAGGTTTTCT CGTTCAGACC 60AGCTCAAAAG ACACCAAAGG AGACATACAG 90 of WT1  
 gene[0055]Array number :: The length of 18 arrangement :: Mold of 93 arrangement :: The number  
 of nucleic acid chains :: Kind of single strand arrangement :: The feature of synthetic DNA  
 arrangement :: Exon 9 arrangement GTGTGAAACC ATTCCAGTGT AAAACTTGTC  
 AGCGAAAGTT CTCCCGGTCC GACCACCTGA 60AGACCCACAC CAGGACTCAT  
 ACAGGTAAAA CAA 93 of WT1 gene[0056]Array number :: The length of 19 arrangement :: Mold  
 of 158 arrangement :: The number of nucleic acid chains :: Kind of single strand arrangement ::  
 The feature of synthetic DNA arrangement :: The exon 10 of WT1 gene is arrangement  
 GTGAAAAGCC CTTCAGCTGT CCGTGGCCAA GTTGTGAGAA AAAGTTTGCC CCGTCAAGATG

60AATTAGTCCG CCATCACAAC ATGCATCAGA a part. GAAACATGAC CAAACTCCAG  
CTGGCGCTTT 120 GAGGGGTCTC CCTCGGGGAC CGTTCAGTGT CCCAGGCA158[0057]array  
number: -- length [ of 20 arrangement ]: -- mold [ of 18 arrangement ]: -- number [ of nucleic  
acid chains ]: -- kind [ of single strand arrangement ]: -- the synthetic DNA arrangement  
AGAGAAGAAG GGAACCCC [0058]array number: -- length [ of 21 arrangement ]: -- mold [ of  
18 arrangement ]: -- number [ of nucleic acid chains ]: -- kind [ of single strand arrangement ]:  
-- the synthetic DNA arrangement GCGTGGGCAG CCTGGGAA [0059]array number: -- length  
[ of 22 arrangement ]: -- mold [ of 16 arrangement ]: -- kind [ of amino acid sequence ]: --  
synthetic peptide arrangement Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln  
5 10 15

---

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-104629

(43) 公開日 平成9年(1997)4月22日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 31/70	ADV		A 6 1 K 31/70	ADV
48/00			48/00	
C 0 7 H 21/04	ZNA		C 0 7 H 21/04	ZNAZ

審査請求 未請求 請求項の数 8 F D (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願平8-144818

(22) 出願日 平成8年(1996)5月16日

(31) 優先権主張番号 特願平7-156672

(32) 優先日 平7(1995)6月1日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000157865

岸本 忠三

大阪府富田林市中野町3丁目5番31号

(71) 出願人 595090392

杉山 治夫

大阪府箕面市船場西2-19-30

(72) 発明者 山上 保

大阪府高槻市真上町6-10-1-607

(72) 発明者 井上 和司

大阪府茨木市玉櫛2-30-17-203

(72) 発明者 杉山 治夫

大阪府箕面市船場西2-19-30

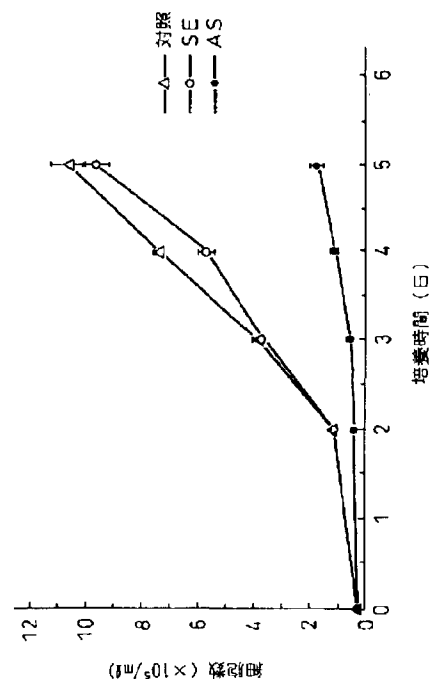
(74) 代理人 弁理士 石田 敬 (外3名)

(54) 【発明の名称】 ウイルス腫瘍遺伝子 (WT1) に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体を含んで成る白血病細胞増殖阻害剤

(57) 【要約】

【課題】 新規なタイプの白血病細胞増殖阻害剤を提供する。

【解決手段】 ウイルス腫瘍遺伝子 (WT1) に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体を含んで成る白血病細胞増殖阻害剤。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ウイルス腫瘍遺伝子(WT1)に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体を含んで成る白血病細胞増殖阻害剤。

【請求項2】 前記アンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体が、ウイルス腫瘍遺伝子の転写キャッピング部位の連続する少なくとも9個のヌクレオチドに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項1に記載の白血病細胞増殖阻害剤。

【請求項3】 前記アンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体が、次の塩基配列：

5'-AGGGTCGAATGCGGTGGG-3' (配列番号：2)又は

5'-TCAAATAAGAGGGGCCGG-3' (配列番号：4)

を有する、請求項2に記載の白血病細胞増殖阻害剤。

【請求項4】 前記アンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体が、ウイルス腫瘍遺伝子の翻訳開始領域の連続する少なくとも9個のヌクレオチドに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項1に記載の白血病細胞増殖阻害剤。

【請求項5】 前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、次の塩基配列：

5'-GTCGGAGCCCATTTGCTG-3' (配列番号：6)

を有する、請求項4に記載の白血病細胞増殖阻害剤。

【請求項6】 前記アンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体が、ウイルス腫瘍遺伝子のエクソン中の連続する少なくとも9個のヌクレオチドに対応するアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項1に記載の白血病細胞増殖阻害剤。

【請求項7】 前記エクソンが第6エクソンである、請求項6に記載の白血病細胞増殖阻害剤。

【請求項8】 前記アンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体が、次の塩基配列：

5'-CGTTGTGTGTTATCGCT-3' (配列番号：8)

を有する、請求項7に記載の白血病細胞増殖阻害剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体を含んで成る、白血病細胞増殖阻害剤に関する。

## 【0002】

【従来の技術】ウイルス(Wilms)腫瘍は、染色体11p13に位置するウイルス腫瘍遺伝子(WT1)の両対立遺伝子の不活性化により生ずる小児腎腫瘍である(Call KM et al., Cell 60: 509, 1990)。WT1の非コード上流配列(C.E.Campbellら、Oncogene 9: 583-595, 1994)及びイントロンを含むコード領域(D.A.Haberら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 88: 9618-9622, (1991))はすでに報告されており、腫瘍等の増殖及び分化に関与することが予想される(D.A.Haberら、前掲)。しかしながら、WT1が白血病細胞の増殖に関与しており、WT1に対

するアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体が白血病細胞の増殖を抑制・阻害することは知られていない。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】従って本発明は、ウイルス(Wilms)腫瘍遺伝子(WT1)に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体を含んで成る白血病細胞の増殖阻害剤を提供するものである。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】本発明は、WT1に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体を含んで成る白血病細胞増殖阻害剤を提供する。本発明で使用するアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、例えば、WT1の転写キャッピング部位に対するもの、翻訳開始領域に対するもの、エクソンに対するものまたはイントロンに対するものなどのWT1に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体である。

【0005】例えばWT1の転写キャッピング部位を含む領域のセンスDNA鎖の塩基配列は配列番号：9で表わされ、またWT1のコード領域のエクソン1～10のセンスDNA鎖の塩基配列は配列番号：10～19で表わされるが、本発明はこのようなWT1のセンスDNA鎖の塩基配列に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体を用いる。このアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、通常WT1のアンチセンスDNA鎖またはRNA鎖の連続した5～50個、好ましくは、9～30個の塩基またはWT1のDNA鎖またはRNA鎖に結合することができるものであれば、断続的または部分的に相補的な5～70個、好ましくは、9～50個の塩基から成るアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体である。

【0006】転写キャッピング部位に対するものとしては、例えば次の塩基配列：5'-AGGGTCGAATGCGGTGGG-3' (配列番号：2)及び5'-TCAAATAAGAGGGGCCGG-3' (配列番号：4)などのものが挙げられる。また、翻訳開始領域に対するものとしては、翻訳開始コドンATG並びにその上流及び/又は下流を含む領域に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体が挙げられ、例えば次の塩基配列：5'-GTCGGAGCCCATTTGCTG-3' (配列番号：6)などが挙げられる。

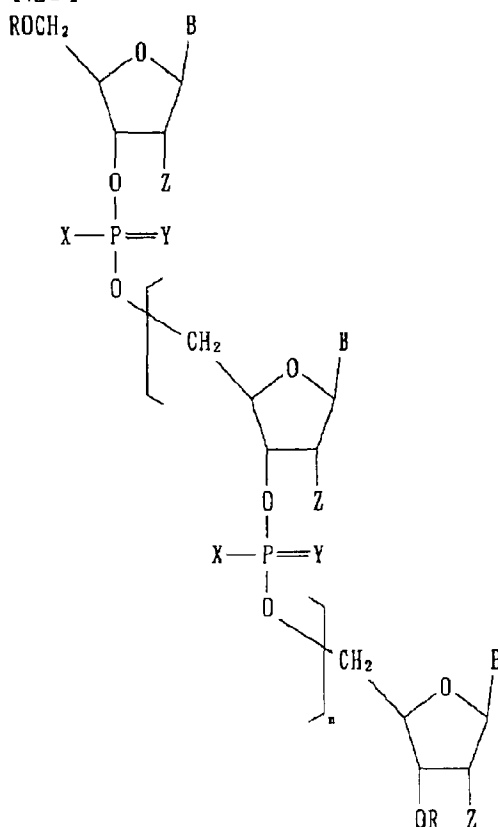
【0007】また、WT1のコード領域には10個のエクソンが含まれており、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、これらのエクソンのいずれかに含まれる配列に対するもの、又はスプライシング後に連続するいずれか2個のエクソンにわたる配列に対するものあるいは、連続するイントロンとエクソンにわたる配列に対するもの、全てのイントロン及び3'、5'側非コード領域の配列に対するものである。1例として、第6エクソンに対するものであり、次の塩基配列：5'-CGTTGTGTGTTATCGCT-3' (配列番号：8)に対するものが挙げられる。さらに、WT1のDNA鎖またはRNA鎖と断続的または部分的に相補的な塩基配列を有する本発

明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は対応する領域については特に問わないが、これらの中には、WT1のDNA鎖またはRNA鎖を切断する機能を有するリボザイムのようなものも含まれる。

【0008】本発明において使用されるアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体の構造は、化1に示したとおりであるが、Xは独立して酸素(O)、イオウ(S)、低級アルキル基あるいは一級アミンまたは二級アミンのいずれでもよい。Yは独立して酸素(O)あるいはイオウ(S)のいずれでもよい。Zは水素または水酸基である。BはZが水素のときアデニン、グアニン、チミン、あるいはシトシンのいずれかから選ばれ、Zが水酸基のときアデニン、グアニン、ウラシルあるいはシトシンのいずれかから選ばれ、主としてWT1をコードするDNA又はmRNAの相補的オリゴヌクレオチドである。Rは独立して水素またはジメトキシトリチル基あるいは低級アルキル基である。nは7-28である。

【0009】

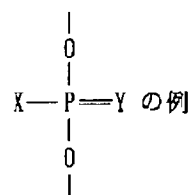
【化1】



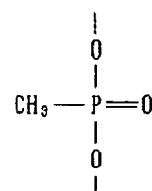
【0010】好ましいアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体としては修飾されていないアンチセンスオリゴヌクレオチドだけでなく、修飾されたアンチセンスオリゴヌクレオチドでもよい。このような修飾体として、例えば前述のメチルホスホネート型又はエチルホスホネート型のような低級アルキルホスホネート修飾体、その他ホスホロチオエート修飾体あるいはホスホロアミデート修飾体等が挙げられる(化2参照)。

【0011】

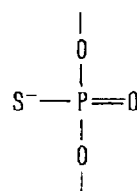
【化2】



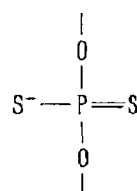
メチルホスホネート



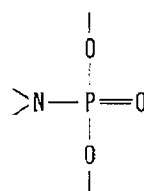
ホスホチオエート



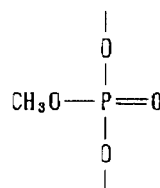
ホスホジチオエート



ホスホロアミデート



リン酸トリエステル



【0012】これらのアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は次のとおり常法によって得ることができる。化1のX及びYがO、Zが水素又は水酸基であるアンチセンスオリゴヌクレオチドは市販のDNA合成装置（例えばApplied Biosystems社製など）によって容易に合成される。

【0013】Zが水素であるアンチセンスオリゴデオキシリボヌクレオチドの合成法はホスホロアミダイトを用いた固相合成法、ハイドロジェンホスホネートを用いた固相合成法などで得ることができる。例えば、T. Atkinson, M. Smith, in *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, ed. M. J. Gait, IRL Press, 35-81 (1981); M. H. Caruthers, *Science*, 230, 281 (1985); A. Kume, M. Fujii, M. Sekine, M. Hata, *J. Org. Chem.*, 49, 2139 (1984); B. C. Froehler, M. Matteucci, *Tetrahedron Lett.*, 27, 469 (1986); P. J. Garegg, I. Lindh, T. Regberg, J. Stawinski, R. Stromberg, C. Henrichson, *ibid.*, 27, 4051 (1986); B. S. Sproat, M. J. Gait, in *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, ed. M. J. Gait, IRL Press, 83-115 (1984); S. L. Beaucage and M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.*, 22, 1859-1862 (1981); M. D. Matteucci and M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.*, 21, 719-722 (1980); M. D. Matteucci and M. H. Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 3185-3191 (1981)

4); M. H. Caruthers, *Science*, 230, 281 (1985); A. Kume, M. Fujii, M. Sekine, M. Hata, *J. Org. Chem.*, 49, 2139 (1984); B. C. Froehler, M. Matteucci, *Tetrahedron Lett.*, 27, 469 (1986); P. J. Garegg, I. Lindh, T. Regberg, J. Stawinski, R. Stromberg, C. Henrichson, *ibid.*, 27, 4051 (1986); B. S. Sproat, M. J. Gait, in *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, ed. M. J. Gait, IRL Press, 83-115 (1984); S. L. Beaucage and M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.*, 22, 1859-1862 (1981); M. D. Matteucci and M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.*, 21, 719-722 (1980); M. D. Matteucci and M. H. Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 3185-3191 (1981)

を参照のこと。

【0014】Xが低級アルコキシ基であるリン酸トリエステル修飾体は、常法、例えば化学合成で得られたオリゴヌクレオチドをトシルクロリドのDMF/メタノール/2, 6-オールチジン溶液で処理することにより得ることができる (Moody H.M., et al., *Nucleic Acids Res.*, 17, 4769-4782 (1989))。Xがアルキル基であるアルキルホスホネート修飾体は、常法、例えばホスホアミダイトを用いて得ることができる (M.A.Dorman, et.al., *Tetrahedron*, 40, 95-102 (1984); K.L.Agarwal and F.Riftina, *Nucleic Acids Res.*, 6, 3009-3024 (1979))。

【0015】XがSであるホスホロチオエート修飾体は、常法、例えばイオウを用いた固相合成法 (C.A.Stein, et.al., *Nucleic Acids Res.*, 16, 3209-3221 (1988)) あるいはテトラエチルチウラム ジスルフィドを用いて、固相合成法により得ることができる (H.Vu and B.L.Hirschbein, *Tetrahedron Letters*, 32, 3005-3008 (1991))。X, YがともにSであるホスホロジチオエート修飾体は、例えばビスアミダイトをチオアミダイトに変換しイオウを作用させることにより固相合成法により得ることができる (W.K.-D.Brill, et.al., *J.Am.Chem.Soc.*, 111, 2321-2322 (1989))。

【0016】Xが一級アミンあるいは二級アミンであるホスホアミデート修飾体は、例えばハイドロジェンホスホネートを一級あるいは二級アミンで処理することにより固相合成法で得ることができる (B.Froehler, et.al., *Nucleic Acids Res.*, 16, 4831-4839 (1988))。あるいは、アミダイトをtert-ブチルハイドロパーオキサイドで酸化しても得ることができる (H.Ozaki, et.al., *Tetrahedron Lett.*, 30, 5899-5902 (1989))。

【0017】Zが水酸基であるアンチセンスオリゴリボヌクレオチドの合成法は、アンチセンスオリゴデオキシリボヌクレオチドに比べて、リボース(糖)に2'-水酸基があるためその保護を行わなければならない点できわめて複雑ではあるが、保護基およびリン酸化方法を適宜選択することによって合成することができる (微生物学基礎講座 8巻、遺伝子工学、大塚栄子、三浦一伸共著、安藤忠彦、坂口健二編、1987年10月10日、共立出版株式会社発行参照)。

【0018】精製および純度確認は、高速液体クロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で行うことができる。分子量の確認は、Electrospray Ionization Mass Spectrometry又はFast Atom Bombardment-Mass Spectrometryで行うことができる。本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、genomic DNA から matureなmRNAに至るいかなる段階においても作用し、その発現を抑制することによって白血病細胞の増殖を阻害すると考えられる。従って、本願発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは白血病の治療のために有効であると期待される。

【0019】さらに本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、後述するとおり、正常な骨髄細胞の増殖を阻害することなく、特異的に白血病細胞の増殖を阻害すると考えられる。したがって、白血病患者の細胞、例えば骨髄細胞または末梢血を体外へ取り出し、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体でin vitro処理して白血病細胞の増殖を阻害しておいて、正常な骨髄細胞だけを再び体内に戻すというような「自家骨髄移植」「自家末梢血幹細胞移植」への応用も可能である。

【0020】本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、それらに対して不活性な適当な基剤と混和して塗布剤、パップ剤などの外用剤とすることができる。また、必要に応じて、賦形剤、等張化剤、溶解補助剤、安定化剤、防腐剤、無痛化剤等を加えて錠剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、リボソームカプセル剤、注射剤、液剤、点鼻剤など、さらに凍結乾燥剤とすることができる。これらは常法に従って調製することができる。

【0021】本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は患者の患部に直接適用するか、または血管内に投与するなどして結果的に患部に到達し得るように患者に適応させる。さらに持続性、膜透過性を高めるアンチセンス封入素材を用いることもできる。例えば、リボゾーム、ポリ-L-リジン、リピッド、コレステロール、リポフェクチン又はこれらの誘導体が挙げられる。

【0022】本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体の投与量は、患者の状態、年齢、性別、体重などに応じて適宜調整し好ましい量を用いることができる。また、その投与方法は、患者の状態、薬剤形態などに応じ、経口投与、筋肉内投与、腹腔内投与、皮内投与、皮下投与、静脈内投与、動脈内投与、直腸投与などの種々の投与方法から適宜好ましい方法を用いることができる。以下本発明を実施例において詳しく説明する。

#### 【0023】

##### 【実施例】

合成例1. 以下に使用するオリゴデオキシリボヌクレオチド(配列番号: 1~8)を、自動合成装置 (Applied Biosystems) を用いて合成し、高速液体クロマトグラフィーにより精製し、エタノール沈澱を3回行い、そしてリン酸緩衝液に懸濁した。合成したオリゴヌクレオチドは次の通りである。

配列番号: 1 転写キャッピング部位のセンス配列 (SE1)

配列番号: 2 転写キャッピング部位のアンチセンス配列 (AS1)

配列番号: 3 転写キャッピング領域のセンス配列 (SE2)

配列番号: 4 転写キャッピング領域のアンチセンス配列 (AS2)

配列番号: 5 翻訳開始領域のセンス配列 (SE3)

配列番号: 6 翻訳開始領域のアンチセンス配列 (AS



3)

配列番号: 7 エクソン6のセンス配列 (SE4)

配列番号: 8 エクソン6のアンチセンス配列 (AS4)

【0024】実施例1. WT1発現陽性の白血病細胞株K562を $5 \times 10^4$  個/ml、 $100 \mu\text{l}$ /ウエルの量で、平底96-ウエルプレート内の、ウシ胎児血清 (FCS) を含有しないRPMI 1640培地に接種した。各オリゴヌクレオチドを、3連のウエルに、最終濃度が $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように添加した。2時間のインキュベーションの後、各ウエルに最終濃度が10%となるようにFCSを添加した。24時間毎に、前記の量の半分のオリゴヌクレオチドを培養物に添加した。

【0025】96時間培養した後、色素排除法により生存細胞を計数した。対照培養物として、ヌクレオチドを含有しない同じ体積のPBSを添加し、そしてこの対照培養物の細胞数を100%とした。この結果を図1に示す。この図から明らかな通り、いずれのアンチセンスオリゴヌクレオチドも、対応するセンスオリゴヌクレオチドに比べて強く細胞の増殖を阻害した。

【0026】実施例2. 実施例1と同様の実験を行ったが、オリゴヌクレオチドSE3及びAS3を種々の濃度で添加した。図2から明らかな通り、センスオリゴヌクレオチド (SE3) は細胞の増殖をほとんど阻害しなかったが、アンチセンスオリゴヌクレオチド (AS3) は濃度依存的に細胞の増殖を阻害した。

【0027】実施例3. 実施例1と同様の実験を行ったが、オリゴヌクレオチドSE4及びAS4を種々の濃度で添加した。図3から明らかな通り、センスオリゴヌクレオチド (SE4) は細胞の増殖をほとんど阻害しなかったが、アンチセンスオリゴヌクレオチド (AS4) は濃度依存的に細胞の増殖を阻害した。

【0028】実施例4. 実施例1と同様の実験を行った。但し、細胞を、平底24-ウエルプレート中で $2.5 \times 10^4$  個/ml、 $1 \text{ ml}$ /ウエルの量で培養した。オリゴヌクレオチドSE3及びAS3を添加し、2~5日間に毎日生存細胞数を計数した。結果を図4に示す。図から明らかな通り、センスオリゴヌクレオチドを添加した場合、対照の場合と同様に細胞の増殖が見られたが、アンチセンスオリゴヌクレオチドを添加した場合、細胞の増殖は抑制された。

【0029】実施例5. 実施例1と同様の実験を行った。但し、オリゴヌクレオチドとして、SE3及びAS3、並びにミエロペロキシダーゼ (MPO) 遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド5'-AGAGAAGAA GGGAACCC-3' (配列番号: 20) (MPO-AS) 及び血液凝固因子V (FV) に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド5'-GCGTGGGCAGCCTGGGAA-3' (配列番号: 21) (FV-AS) を用いた。図5から明らかなように、AS3を用いた場合のみ細胞の増殖が阻害され

た。

【0030】実施例6. 実施例1と同様の実験を行ったが、実験細胞として、WT1発現陽性細胞株HEL及びTHP-1、並びにWT1発現陰性細胞株U937を用いた。オリゴヌクレオチドとしては、実施例1の場合と同じ8種類を用いた。WT1発現陽性細胞系HEL (図6) 又はTHP-1 (図7) を用いた場合には、アンチセンスオリゴヌクレオチドにより細胞の増殖は阻害された。これに対して、WT1発現陰性細胞株U937 (図8) を用いた場合、アンチセンスオリゴヌクレオチドを添加しても細胞の増殖は阻害されなかった。

【0031】実施例7. 白血病患者及び健康な志願者からの骨髓細胞をヘパリン処理し、RPMI 1640培地に懸濁し、そしてFicoll-Hypaque密度勾配遠心により骨髓単核球細胞を得た。GM-CSF ( $100 \text{ ng}/\text{ml}$ ) 及びIL-3 ( $100$  ユニット/ml) を含む $\alpha$ -MEMを入れた平底96-ウエルプレートに、上記の単核細胞を $1.5 \times 10^6$  個/ml、 $100 \mu\text{l}$ /ウエルの量でプレートした。オリゴヌクレオチド (SE3及びAS3) による処理は実施例1と同様にした。96時間後、細胞を集め、そしてメチルセルロース培地 [ $1.2\%$  メチルセルロース $\alpha$ -MEM、 $20\%$  FCS、GM-CSF ( $100 \text{ ng}/\text{ml}$ )、G-CSF ( $100 \text{ ng}/\text{ml}$ )、IL-3 ( $100$  ユニット/ml) 及びSCF ( $10 \text{ ng}/\text{ml}$ )] にプレートした。培養は3連で行った。14日目に白血病細胞コロニー (CFU-L) 及び顆粒球-マクロファージコロニー (CFU-GM) を計数した。

【0032】図9に白血病患者4名 (急性骨髄性白血病 (AML) 2名、慢性骨髄性白血病 (CML) 2名) からのサンプルでの白血病コロニーの形成を示す。アンチセンスオリゴヌクレオチドによりコロニーの出現が阻害されたことがわかる。図10には、健康な志願者からのサンプルでの顆粒球マクロファージコロニーの出現を示す。アンチセンスオリゴヌクレオチドによってもコロニーの形成は阻害されなかった。

【0033】実施例8. 24-ウエルプレート中で、 $5 \times 10^4$  細胞/ウエルのK562細胞 (A) 又はAMLを有する患者からの新鮮な白血病細胞 (B) に、ランダムオリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチドAS1、オリゴヌクレオチドAS2又はオリゴヌクレオチドAS3を $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で添加し、さらに24時間毎に $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で添加した。オリゴヌクレオチドによる最初の処理から4日後に細胞を取得し、PBSにより洗浄し、そしてLacmliのサンプル緩衝液により細胞溶解した。

【0034】 $2 \times 10^4$  個の細胞からの各細胞溶解物を5分間煮沸し、そして次に $7.5\%$  ドデシル硫酸ナトリウム ポリアクリルアミドゲル中の各レーンに適用した。電気泳動の後、蛋白質をインモビロン (Immobilon) ポリビニルデンジフルオリド・フィルター (Millipore

Corp. MA, 米国)に移行させた。このフィルターを、合成ポリペプチド(アミノ酸位置177-192; Lys His Glu Asp Pro Met GlyGln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln (配列番号: 22)に対する抗-WT1ポリクローナル抗体によりプローブし、そして次にホースラディッシュパーオキシダーゼ-結合抗-免疫グロブリン抗体(Amersham, Little Chalfont, 英国)により処理した。洗浄後、フィルターを検出試薬(Amersham, Little Chalfont, 英国)に1時間浸漬し、そして1~5分間オートラジオグラフ処理した。

【0035】TBST(0.05% Tween 20 を含有するTris-緩衝液)により2回洗浄した後、フィルターを抗-アクチンモノクローナル抗体(Oncogene Science Inc., NY, 米国)によりプローブし、そして上記のようにしてオートラジオグラフ処理した。WT1蛋白質及びアクチンに対応するバンドの密度をデンストメーターCS-9000(シミズ、京都)により測定し、そしてWT1/アクチン比を計算した。

【0036】結果を図11のA及びBに示す。この図において、レーン1はランダムオリゴヌクレオチドを添加した場合、レーン2はオリゴヌクレオチドAS3を添加した場合、レーン3はオリゴヌクレオチドAS1を添加した場合、そしてレーン4はオリゴヌクレオチドAS2を添加した場合の結果を示す。この図のAはK562細胞

配列

CCCACCGCAT TCGACCT

18

【0039】配列番号: 2

配列の長さ: 18

配列の型: 核酸

配列

AGGGTCGAAT GCGGTGGG

18

【0040】配列番号: 3

配列の長さ: 18

配列の型: 核酸

配列

CGGGCCCCCTC TTATTGA

18

【0041】配列番号: 4

配列の長さ: 18

配列の型: 核酸

配列

TCAAATAAGA GGGGCCGG

18

【0042】配列番号: 5

配列の長さ: 18

配列の型: 核酸

配列

CAGCAAATGG GCTCCGAC

18

【0043】配列番号: 6

配列の長さ: 18

配列の型: 核酸

配列

胞を用いた場合、そしてBはAMLを有する患者からの新鮮な白血病細胞を用いた場合の結果を示す。

【0037】Aから明らかなように、K562細胞の培地にWT1オリゴヌクレオチドを添加した場合、WT1蛋白質のレベルが有意に低下した。他方、対照としてのランダムオリゴヌクレオチドはWT1蛋白質レベルに影響を与えなかった。また、Bから明らかなように、WT1オリゴヌクレオチドをAMLを有する患者から新たに単離した白血病細胞の培地に添加した場合、WT1蛋白質レベルが有意に低下した。これらの結果は、WT1アンチセンスオリゴヌクレオチドが、WT1蛋白質レベルの低下を介して白血病細胞の増殖を特異的に阻害したことを明瞭に示している。以上の通り、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは白血病細胞の増殖の阻害のために有効であり、従って新規な白血病治療剤として期待される。

【0038】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 18

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

配列の種類: 合成DNA

鎖の数: 一本鎖

配列の種類: 合成DNA

鎖の数: 一本鎖

配列の種類: 合成DNA

鎖の数: 一本鎖

配列の種類: 合成DNA

鎖の数: 一本鎖

配列の種類: 合成DNA

鎖の数: 一本鎖

配列の種類: 合成DNA

GTGGGAGCCC ATTTGCTG 18  
 【0044】配列番号：7 鎖の数：一本鎖  
 配列の長さ：18 配列の種類：合成DNA  
 配列の型：核酸

配列  
 AGCGATAACC ACACAACG 18  
 【0045】配列番号：8 鎖の数：一本鎖  
 配列の長さ：18 配列の種類：合成DNA  
 配列の型：核酸

配列  
 CGTTGTGTGG TTATCGCT 18  
 【0046】配列番号：9 鎖の数：一本鎖  
 配列の長さ：1272 配列の種類：合成DNA  
 配列の型：核酸

配列  
 TGGTATCCTC GACCAGGGCC ACAGGCAGTG CTCGGCGGAG TGGCTCCAGG AGTTACCCGC 60  
 TCCCTGCCGG GCTTCGTATC CAAACCTCC CCTTCACCCC TCCTCCCAA ACTGGGGGCC 120  
 AGGATGCTCC GGCCGAATA TAOCAGGCT TTGGGCGTTT GCCAAGGTT TTCTTCCCTC 180  
 CTAAACTAGC CGCTGTTTC CCGGCTTAA CGTAGAAGAA TTAGATATTC CTCACCTGGAA 240  
 AGGGAACTA AGTGCTGCTG ACTCCAATT TAGGTAGGCG GCAACCGCT TCCGCTGGC 300  
 GCAAACCTCA CCAAGTAAAC AACTACTAGC CGATCGAAAT ACGCCCGCT TATAACTGGT 360  
 GCAACTCCCG GCCACCCAAC TGAGGGACGT TCGCTTTCAG TCCCGACCTC TGGAACCCAC 420  
 AAAGGGCCAC CTCTTTCCC AGTGACCCA AGATCATGGC CACTCCCTA CCCGACAGTT 480  
 CTAGAGCAAG AGCCAGACTC AAGGGTGCAA AGCAAGGTA TACGCTTCTT TGAAGCTTGA 540  
 CTGAGTTCTT TCTGCGCTTT CTTGAAGTTC CCGCCCTCTT GGAGCCTACC TGCCCTCCC 600  
 TCCAAACCAC TCTTTTAGAT TAACAACCCC ATCTCTACTC CCACCGCATT CGACCTGCC 660  
 CGGACTCACT GCTACTGAAC GGAATCTCCA GTGAGACGAG GCTCCACAC TGGCGAAGGC 720  
 AAGAAGGGGA GGTGGGGGA GGGTTGTGCC ACACCGCCA GCTGAGAGCG CGTGTGGGT 780  
 TGAAGAGGAG GGTGTCTCG AGAGGACGC TCCCTCGGAC CCGCCCTCAC CCCAGCTCG 840  
 AGGGCGCCCC CAAGGAGCAG CGCGCTGC CTGGCCGGC TTGGCTGCT GAGTGAATGG 900  
 AGCGGCCGAG CCTCTGGCT CTTCTCTTC CCCGCGCGC CGGCCCTCT TATTGAGCT 960  
 TTGGGAAGCT GAGGGCAGC AGGCAGCTGG GGTAAAGAGT TCAAGGCAGC GCCACACCC 1020  
 GGGGGCTCTC CGCAACCCA CGCCTGTGC CTCCTCCACT TCCCGCCCTC CTCCACCT 1080  
 ACTATTAC CCAACCCC ACCAGAGCC GGGACGGCAG CCCAGGCGC CGGGCCCGC 1140  
 CGTCTCTCG CCGGATCTT GGAATCTCT TTGCTGCAGG ACCCGGCTT CACGTGTGTC 1200  
 CCGGAGCCCG CGTCTCAGA CAGCTCCGC TCCGGGCTG GGTGCCTACA GCAGCCAGAG 1260  
 CAGCAGGGAG TC 1272

【0047】配列番号：10 鎖の数：一本鎖  
 配列の長さ：457 配列の種類：合成DNA  
 配列の型：核酸 配列の特徴：WT1遺伝子のエクソン1の一部分

配列  
 TCTGAGCTC AGCAAATGGG CTCGACGTG CGGGACCTGA ACGCGTGTCT GCCCGCCGTC 60  
 CCTTCCCTGG GTGGCGGCG CGGCTGTGCC CTGCTGTGA GCGGCGGCG GCAGTGGGCG 120  
 CCGGTGCTGG ACTTTGCGCC CCGGGCGCT TCGCTTACG GGTCTTGGG CGGCCCGCG 180  
 CCGCACCGG CTCGCGGCC ACCCGCGCG CCGCGCTC ACTCTTCAT CAAACAGGAG 240  
 CCGAGCTGG GCGGCGGGA GCGCACGAG GAGCAGTGCC TGAGCGCTT CACTGTCCAC 300  
 TTTTCCGGCC AGTTCACTGG CACAGCCGA GCTGTGCT ACGGCGCTT CGGTCTCTT 360  
 CCGCCAGCC AGGCGTCATC CGGCCAGGC AGGATGTTT CTAACGCGCC CTACCTGCC 420  
 AGCTGCTCG AGAGCCAGCC CGCTATTGC AATCAGG 457

【0048】配列番号：11 配列の長さ：123

配列の型：核酸  
鎖の数：一本鎖

配列の種類：合成DNA  
配列の特徴：WT1遺伝子のエクソン2

配列  
GTTACAGCAC GGTACCTTC GACGGGACGC CCAGCTACGG TCACACGCC TCGCACCATG 60  
CGGCGCAGTT CCCCAACCAC TCATTCAAGC ATGAGGATCC CATGGGCCAG CAGGGCTCGC 120  
TGG 123

【0049】配列番号：12  
配列の長さ：103  
配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖  
配列の種類：合成DNA  
配列の特徴：WT1遺伝子のエクソン3

配列  
GTGAGCAGCA GTACTCGGTG CCGCCCCCGG TCTATGGCTG CCACACCCCC ACCGACAGCT 60  
GCACCGCAG CCAGGCTTGG CTGCTGAGGA CGCCCTACAG CAG 103

【0050】配列番号：13  
配列の長さ：78  
配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖  
配列の種類：合成DNA  
配列の特徴：WT1遺伝子のエクソン4

配列  
TGACAATTTA TACCAATGA CATCCAGCT TGAATGCATG ACCTGGAATC AGATGAACCT 60  
AGGAGCCACC TTAAAGG 78

【0051】配列番号：14  
配列の長さ：51  
配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖  
配列の種類：合成DNA  
配列の特徴：WT1遺伝子のエクソン5

配列  
AGTTGCTGCT GGGAGCTCCA GCTCAGTGAA ATGGACAGAA GGGCAGAGCA A 51

【0052】配列番号：15  
配列の長さ：97  
配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖  
配列の種類：合成DNA  
配列の特徴：WT1遺伝子のエクソン6

配列  
CCACAGCACA GGGTACGAGA GCGATAACCA CACAACGCC ATCCTCTGCG GAGCCCAATA 60  
CAGAATACAC ACGCACGGTG TCTTCAGAGG CATTACAG 97

【0053】配列番号：16  
配列の長さ：151  
配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖  
配列の種類：合成DNA  
配列の特徴：WT1遺伝子のエクソン7

配列  
GATGTGCGAC GTGTGCCTGG AGTAGCCCCG ACTCTGTAC GGTCGGCATC TGAGACCAGT 60  
GAGAAAGCC CCTTCATGTG TGCTTACCCA GGCTGCAATA AGAGATATTT TAAGCTGTCC 120  
CACTTACAGA TGCACAGCAG GAAGCACACT G 151

【0054】配列番号：17  
配列の長さ：90  
配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖  
配列の種類：合成DNA  
配列の特徴：WT1遺伝子のエクソン8

配列  
GTGAGAAACC ATACCAGTGT GACTTCAAGG ACTGTGAACG AAGGTTTTCT CGTTCAGACC 60  
AGCTCAAAG ACACCAAAGG AGACATACAG 90

【0055】配列番号：18  
配列の長さ：93  
配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖  
配列の種類：合成DNA  
配列の特徴：WT1遺伝子のエクソン9

配列  
GTGTGAAACC ATTCCAGTGT AAACTTGTG AGCGAAAGTT CTCCCGGTCC GACCACCTGA 60  
AGACCCACAC CAGGACTCAT ACAGGTAAAA CAA 93

【0056】配列番号：19  
配列の長さ：158

配列の型：核酸  
鎖の数：一本鎖

配列の種類：合成DNA

配列の特徴：WT1遺伝子のエクソン10の一部

配列

GTGAAAAGCC CTTAGCTGT CGGTGGCCAA GTTGCAGAA AAAGTTTGCC CGGTCAGATG 60  
 AATTAGTCCG CCATCACAAC ATGCATCAGA GAAACATGAC CAACTCCAG CTGGCGCTTT 120  
 GAGGGGTCTC CCTCGGGGAC CGTTCAGTGT CCCAGGCA 158

【0057】配列番号：20

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列の種類：合成DNA

配列

AGAGAAGAAG GGAACCCC

【0058】配列番号：21

配列の長さ：18

配列

Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln

5

10

15

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、白血病細胞株K562の増殖に対するオリゴヌクレオチドの阻害効果を示すグラフである。

【図2】図2は、オリゴヌクレオチドSE3及びAS3の濃度と、白血病細胞株K562の増殖との関連を示すグラフである。

【図3】図3は、オリゴヌクレオチドSE4及びAS4の濃度と、白血病細胞株K562の増殖との関係を示すグラフである。

【図4】図4は、オリゴヌクレオチドSE3及びAS3が白血病細胞株K562の増殖に及ぼす効果を経時的に示すグラフである。

【図5】図5は、種々のオリゴヌクレオチドが白血病細胞株K562の増殖に及ぼす影響を示すグラフである。

【図6】図6は、WT1発現陽性の白血病細胞株HELの増殖に対する種々のオリゴヌクレオチドの阻害効果を示すグラフである。

【図7】図7は、WT1発現陽性の白血病細胞株THP-1の増殖に対する種々のオリゴヌクレオチドの阻害効果を示すグラフである。

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列の種類：合成DNA

配列

GCGTGGGAG CCTGGGAA

【0059】配列番号：22

配列の長さ：16

配列の型：アミノ酸

配列の種類：合成ペプチド

果を示すグラフである。

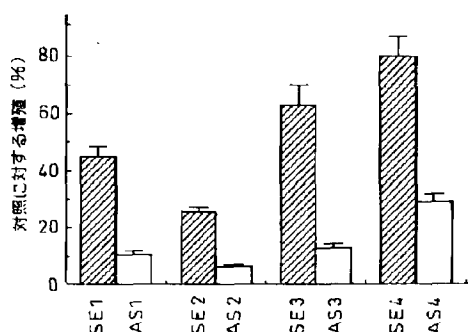
【図8】図8は、WT1発現陰性の悪性リンパ腫細胞株U937の増殖に対する種々のオリゴヌクレオチドの阻害効果を示すグラフである。

【図9】図9は、白血病患者由来の骨髓単核球細胞からの白血病細胞コロニーの形成に対するオリゴヌクレオチドSE3及びAS3の効果を示すグラフである。

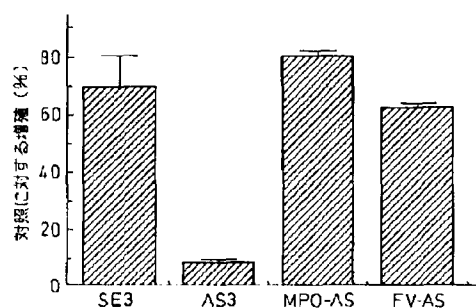
【図10】図10は、健康な志願者由来の骨髓単核球細胞からの顆粒球マクロファージコロニーの形成に対するオリゴヌクレオチドSE3及びAS3の効果を示すグラフである。

【図11】図11において、AはK562細胞の培養液に種々のWT1アンチセンスオリゴヌクレオチドを添加した場合に細胞中のWT1蛋白質のレベルが低下したことを示す電気泳動図の図面代用写真であり、BはAMLを有する患者からの新鮮な白血病細胞にWT1アンチセンスオリゴヌクレオチドを添加した場合に細胞中のWT1蛋白質のレベルが低下したことを示す電気泳動図の図面に代る写真である。

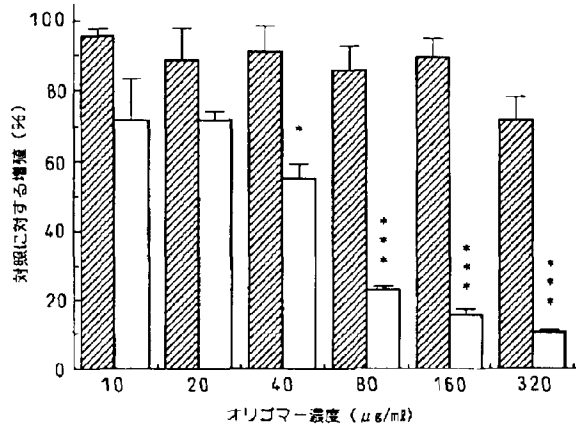
【図1】



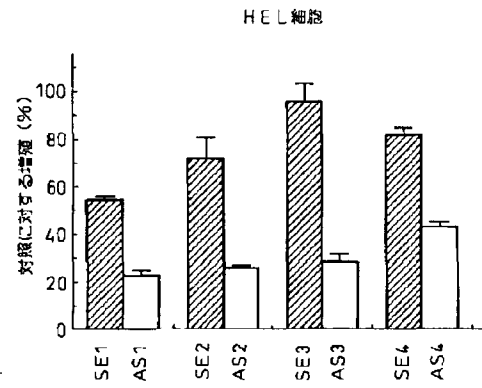
【図5】



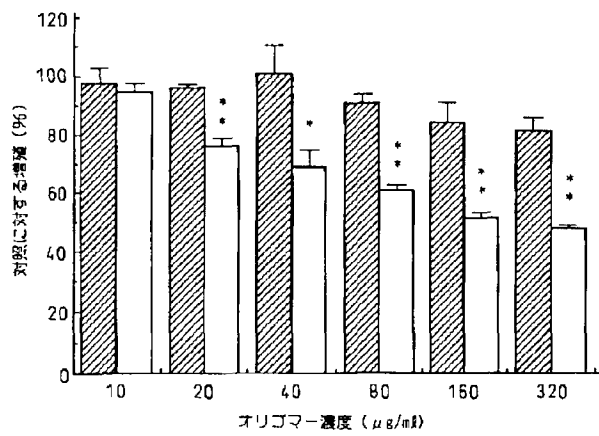
【図2】



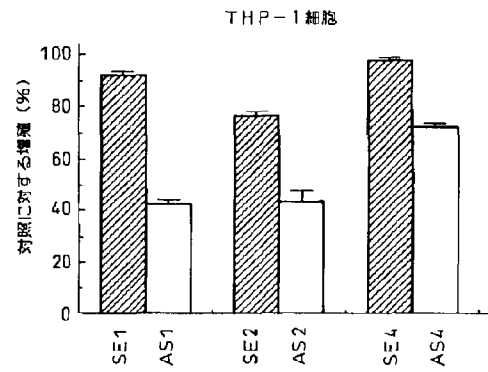
【図6】



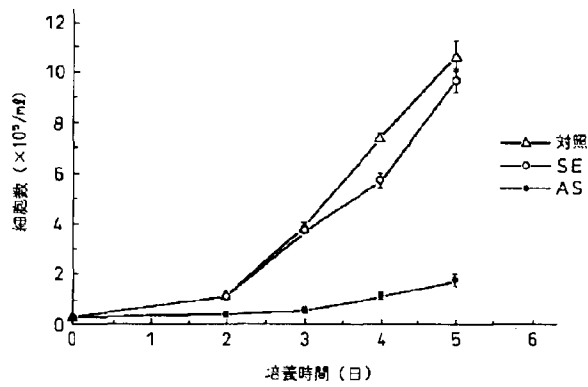
【図3】



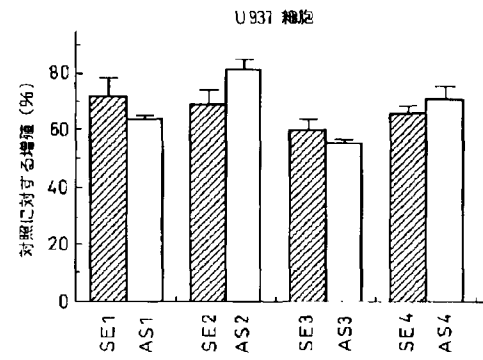
【図7】



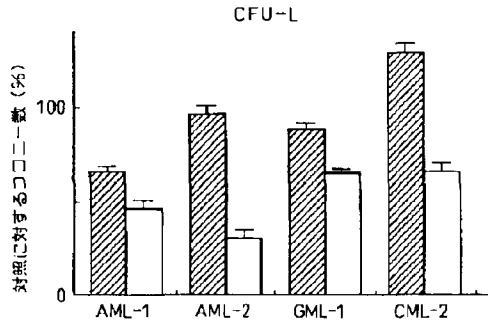
【図4】



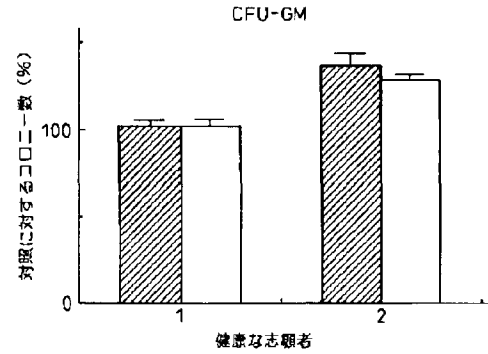
【図8】



【図9】

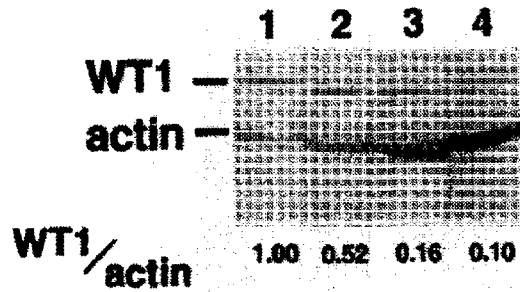


【図10】



【図11】

図面代用写真

**A****B**